

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1907-1908

N° 70

CONTRIBUTION

AUX

PROCÉDÉS DE RECHERCHE

DU

BACILLE DE KOCH

(PROCÉDÉ CHORISIMÉTRIQUE PER ASCENSUM)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le 24 Janvier 1908

PAR

Jean-André-Alphonse COURATTE-ARNAUDE

Né à Lasseube (Basses-Pyrénées), le 30 Novembre 1882

Examineurs de la Thèse :	{	MM. ARNOZAN	professeur. Président
		VERGELY	professeur.)
		CABANNES	agrége } Juges
		MONGOUR	agrége }

Le Candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'Enseignement médical.

BORDEAUX

IMPRIMERIE MODERNE — A. DESTOUT AINÉ & C^{ie}

139, Rue Sainte-Catherine et 8, Rue Paul-Bert

1908



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1907-1908

N° 70

CONTRIBUTION

AUX

PROCÉDÉS DE RECHERCHE

DU

BACILLE DE KOCH

(PROCÉDÉ CHORISIMÉTRIQUE PER ASCENSUM)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le 24 Janvier 1908

PAR

Jean-André-Alphonse COURATTE-ARNAUDE

Né à Lasseube (Basses-Pyrénées), le 30 Novembre 1882



Examineurs de la Thèse :

{ MM. ARNOZAN
VERGELY
CABANNES
MONGOUR

professeur. *Président*
professeur.
agrégé..... } *Juges*
agrégé..... }

Le Candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'Enseignement médical.

BORDEAUX

IMPRIMERIE MODERNE — A. DESTOUT AINÉ & C^{ie}

139, Rue Sainte-Catherine et 8, Rue Paul-Bert

1908

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux

M. PITRES..... Doyen | M. DE NABIAS..... Doyen honoraire

PROFESSEURS :

MM. DUPUY	}	Professeurs honoraires.
MASSE		
	MM.	MM.
Clinique interne.....	{ PICOT	BLAREZ
	{ PITRES	GUILLAUD
Clinique externe.....	{ DEMONS	DUPOUY
	{ LANELONGUE	DE NABIAS
Pathologie et thérapeu- tique générales.....	VERGELY	FERRÉ
Thérapeutique.....	ARNOZAN	
Médecine opératoire...	VILLAR	
Clinique d'accouche- ments.....	LEFOUR	
Anatomie pathologique	COÏNE	DENUCE
Anatomie.....	GENTES (chargé)	BOURSIER
Anatomie générale et histologie.....	VIAULT	
Physiologie.....	JOLYET	MOUSSOUS
Hygiène.....	LAYET	DENIGES
Médecine légale.....	L. LANDE	
Physique biologique et électricité médicale.	BERGONIE	SIGALAS
		LE DANTEC

PROFESSEURS ADJOINTS :

Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	MM. DUBREUILH
Clinique des maladies des voies urinaires.....	POUSSON
Clinique des maladies du larynx, des oreilles et du nez.....	MOURE
Clinique des maladies mentales.....	RÉGIS

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

SECTION DE MÉDECINE (*Pathologie interne et Médecine légale.*)

MM. MONGOUR	MM. ABADIE
CABANNES	CRUCHET
VERGER	

SECTION DE CHIRURGIE ET ACCOUCHEMENTS

Pathologie externe {	MM. BÉGOIN	Accouchements {	MM. ANDÉRODIAS
	VENOT		PERY
	GUYOT		

SECTION DES SCIENCES ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES

Anatomie.....	{	MM. GENTES	Physiologie.....	MM. GAUTRELET
	{	CAVALIÉ	Histoire naturelle {	BEILLE
				MANDOUL

SECTION DES SCIENCES PHYSIQUES

Chimie.....	M. BENECH	Pharmacie.....	{	MM. BARTHE
				LABAT

COURS COMPLÉMENTAIRES :

Pathologie interne.....	MM. RONDOT
Accouchements.....	PERY
Physiologie.....	GAUTRELET
Ophthalmologie.....	LAGRANGE
Clinique dentaire.....	CAVALIÉ

Le Secrétaire de la Faculté : LEMAIRE

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

Faible témoignage de ma reconnaissance

A TOUS MES PARENTS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE DOCTEUR CH. MONGOUR

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE BORDEAUX

MÉDECIN DES HOPITAUX

OFFICIER D'ACADÉMIE

A MONSIEUR LE DOCTEUR GENTES

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE BORDEAUX

CHARGÉ DU COURS D'ANATOMIE

OFFICIER D'ACADÉMIE

A MONSIEUR LE DOCTEUR ANDRE BOURSIER

PROFESSEUR DE CLINIQUE GYNÉCOLOGIQUE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE BORDEAUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE LA SOCIÉTÉ DE CHIRURGIE
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE DOCTEUR ARNOZAN

PROFESSEUR DE THÉRAPEUTIQUE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE BORDEAUX

MÉDECIN HONORAIRE DES HOPITAUX

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

AVANT-PROPOS

Arrivé au terme de nos études, il nous est particulièrement agréable de profiter de l'occasion qui nous est offerte aujourd'hui de réunir dans un même sentiment de reconnaissance nos maîtres de la Faculté et des Hôpitaux. Leur dévouement, leur patience et leur indulgence n'eurent rien d'égal que leur science. C'est à eux que nous devons toute notre instruction médicale ; aussi, au moment de notre départ, sommes-nous heureux de leur exprimer toute notre gratitude.

Dès notre première année, nous avons eu la bonne fortune de rencontrer trois maîtres qui ne devaient cesser, pendant tout le temps de nos études, de nous témoigner le plus constant et le plus bienveillant intérêt : ce sont MM. les D^{rs} Durand, Mongour et Gentes. Le premier, M. le Dr Durand nous initia aux difficultés incessantes de la clinique et nous enseigna, pratiquement, la haute portée sociale de la médecine. A l'esprit critique avisé du second, M. le Professeur agrégé Mongour, nous devons d'avoir compris les liens étroits qui unissent la clinique et le laboratoire. Mais s'il a su nous intéresser à la recherche de problèmes parfois insolubles au lit du malade, il a su aussi nous mettre en garde contre le danger de toute exclusion systématique. Quant à M. le Professeur agrégé Gentes, il fut pour nous un maître et un ami de tous les instants. Maître, il nous permit d'apprécier les ressources de son enseignement si clair, si méthodique, et qui laisse dans l'esprit une empreinte si vivante ; — ami, nous le trouvâmes toujours à nos côtés dans les moments difficiles. Nous lui devons aussi d'avoir été reçu dans le laboratoire de

notre regretté maître M. le Professeur Cannieu, dont nous saluons ici la mémoire.

C'est enfin pour nous un agréable devoir que d'adresser tous nos remerciements à M. le Professeur Boursier, qui nous apprit les secrets de la gynécologie, — à M. le Professeur Ferré qui, avec une patience inlassable, nous apprit les principes et la technique de la bactériologie.

M. le Professeur Arnozan, qui nous a déjà fait l'honneur de vulgariser parmi ses élèves notre procédé chorismétrique, nous fait aujourd'hui celui d'accepter la présidence de notre thèse. Nous en sentons tout le prix et nous l'assurons de toute notre reconnaissance.

INTRODUCTION

Nous avons donné à notre procédé le nom de chorisimétrique *per ascensum*, parce qu'il utilise la propriété que possède l'éther de séparer (χωρίσις, séparation) le bacille de Koch des liquides dans lesquels il se trouve et de l'entraîner avec lui dans son ascension.

Le terme chorisimétrique a été appliqué pour la première fois par M. le Professeur Denigès à une méthode de dosage dont le principe est le suivant : provoquer par l'addition d'un réactif soit physique, soit chimique, dans une solution donnée, la séparation d'un liquide non miscible au reste du mélange. Selon que le liquide à mesurer occupe la partie supérieure ou inférieure, la méthode est dite *per ascensum* ou *per descensum*.

Ce procédé fut imaginé par nous, en 1902, au cours de recherches que nous avons entreprises à propos des matières grasses des crachats tuberculeux sur les conseils de notre maître M. le Professeur agrégé Mongour. C'est grâce à lui, grâce à l'installation qu'il obtint pour nous d'un petit laboratoire, salle 12, à l'hôpital Saint-André, que nous avons pu observer dans tous ses détails le phénomène dont l'application fait aujourd'hui le sujet de notre travail. MM. les Drs Courtin et Sabrazès voulurent à ce moment (7 décembre 1902, *Gazette hebdomadaire des Sciences médicales de Bordeaux*) nous donner l'hospitalité dans leur journal. Nous sommes heureux de les remercier ici publiquement.

Notre travail est fait en vue des applications pratiques d'un procédé simple.

Aussi, laissant de côté toute question dogmatique, nous avons indiqué, dans le Chapitre I, la façon de distinguer un acido-résistant vrai d'un acido-résistant accidentel, grâce à une technique précise de coloration.

Dans le Chapitre II, nous décrivons la technique du procédé chorisimétrique appliqué aux crachats.

Le Chapitre III est consacré à l'explication du mécanisme de ce procédé.

Les Chapitres IV, V et VI s'adressent à l'application du procédé aux matières fécales, au sang, aux exsudats séro-fibrineux, à l'urine, au liquide céphalo-rachidien.

Dans le Chapitre VII, nous examinons la valeur comparative du procédé chorisimétrique et des autres moyens de laboratoire pour le diagnostic de la tuberculose.

Viennent enfin nos conclusions.

CHAPITRE I

Le bacille de Koch et les bacilles acido-résistants

En 1882, Koch découvrit le bacille qui porte son nom en traitant des crachats, fixés en couche mince sur une lame, par un bain colorant ainsi composé :

Solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène.....	1 volume
Solution de potasse à 40 p. 100.....	2 —
Eau distillée	200 cc.

Les préparations pouvaient séjourner un jour dans la solution froide ou quelques heures seulement en chauffant à 40° ou 50°. En plongeant alors les préparations dans une solution aqueuse concentrée de vésuvine, on observe qu'au bout d'un quart d'heure environ la couleur brune s'est substituée à la teinte primitive bleue dans tous les éléments retenant faiblement la couleur, tandis qu'elle persiste sur les bacilles tuberculeux, dès lors facilement reconnaissables, colorés en bleu sur un fond d'éléments bruns. La réaction était d'autant plus caractéristique que, d'après les recherches de Koch, aucune autre bactérie ne se comportait de la sorte, excepté toutefois le bacille de la lèpre, que d'autres particularités peuvent, du reste, faire aisément distinguer.

La méthode de Koch n'a qu'un intérêt historique. On se sert aujourd'hui de la méthode de Ziehl-Neelsen.

Les réactifs nécessaires sont :

1° La liqueur de Ziehl.

2° L'acide nitrique au tiers.

3° Une solution aqueuse de bleu de méthylène.

4° L'alcool absolu.

La liqueur de Ziehl doit être préparée de la façon suivante (Bezançon) :

Broyer dans un mortier 1 gramme de fuchsine rubine dans 10 centimètres cubes d'alcool absolu, ajouter 5 grammes d'acide phénique neigeux, puis par petites portions, en continuant de remuer, 60 centimètres cubes d'eau distillée environ ; verser dans un flacon, rincer le mortier avec 40 centimètres cubes d'eau distillée, laisser reposer vingt-quatre heures, filtrer.

La liqueur définitive ainsi obtenue aura donc pour formule :

Fuchsine basique	1 gramme
Alcool absolu	40 cc.
Eau phéniquée à 5 p. 100	100 cc.

Pour colorer le bacille de Koch on verse à la surface de la préparation la liqueur colorante et on la chauffe jusqu'à dégagement de vapeurs, sans aller cependant jusqu'à l'ébullition. On retire alors la préparation et on ne la met à nouveau au-dessus de la flamme que lorsque les vapeurs ont cessé de se dégager ; on recommence trois fois cette petite opération.

Le bacille de Koch ainsi coloré présente une propriété qui le distingue de la plupart des autres microbes ; il ne se décolore pas lorsqu'on fait tomber sur la préparation quelques gouttes d'acide nitrique au tiers et qu'on traite la préparation ensuite par l'alcool absolu.

Laver et colorer dans une solution aqueuse de bleu de méthylène.

La propriété acido-résistante tient à la présence dans sa masse d'acides gras, en particulier d'acide palmitique et de cire. Les extraits étherés et chloroformés du bacille possèdent cette propriété acido-résistante. Mais Auclair, dans une communication récente à l'Académie des sciences (1907),

ayant épuisé les bacilles par l'éther pendant quatre mois a constaté que la trame cellulosique contenait encore des principes acido-résistants. Cette propriété n'existe pas à toutes les phases de développement du bacille de Koch, elle est absente chez les bacilles très jeunes qui commencent à se développer sur les milieux de culture; elle manque ou est incomplète dans certaines races de bacilles de Koch transformées artificiellement en races donnant des cultures dites homogènes.

La propriété acido-résistante n'est pas absolument spéciale au bacille de Koch, mais s'observe dans un certain nombre de microbes plus ou moins voisins du bacille de Koch et groupés sous la rubrique de bacilles acido-résistants.

D'après Bezançon et Philibert (1905) on a confondu sous ce terme des microbes très différents entre eux, qui n'ont pas au même degré la propriété acido-résistante. Il faut les diviser en deux catégories : l'une comprend des microbes qui ressemblent tous au bacille de Koch et qui sont héréditairement acido-résistants, ce sont les bacilles tuberculoïdes; la seconde catégorie comprend des genres différents entre eux, qui ne sont acido-résistants que dans des conditions spéciales : ils méritent le nom de bacilles accidentellement acido-résistants.

Les bacilles accidentellement acido-résistants se rencontrent dans les sécrétions grasses de l'homme ou dans les liquides séro-fibrineux ou le sang. Ils sont susceptibles d'emprunter temporairement à ces milieux une enveloppe superficielle de graisse qui les rend transitoirement acido-résistants. Ces bacilles se rencontrent dans le smegma, le cérumen, certains pus, certains crachats de gangrène pulmonaire; ils ont pu exposer à l'erreur pour le diagnostic bactériologique du bacille de Koch dans les crachats, l'urine, les liquides séro-fibrineux, etc.

Les bacilles tuberculoïdes peuvent entrer en parallèle avec le bacille de Koch. On les trouve dans le lait, les fourrages, le fumier et quelquefois sur l'homme.

On évitera l'erreur de confondre ces deux espèces de bacilles si on emploie pour rechercher le bacille de Koch la coloration à chaud par le liquide de Ziehl, suivie d'une décoloration énergique par l'acide nitrique au tiers, puis par l'alcool.

Cette réaction alcoolo-acido-résistante éliminera tous les bacilles accidentellement acido-résistants.

CHAPITRE II

Recherche du bacille de Koch dans les crachats Technique du procédé chorisimétrique

Le diagnostic de la tuberculose pulmonaire à ses différentes périodes ou dans ses formes cliniques si variées est considérablement facilité par l'examen microscopique des crachats. Les symptômes fonctionnels du début de la maladie font affirmer une chlorose, une anémie quelconque, une dyspepsie, une bronchite vulgaire. L'hémoptysie, elle-même, compte parmi les accidents de l'hystérie, du rétrécissement mitral, de l'infarctus pulmonaire. Les signes stéthoscopiques de la période de ramollissement rendent possible la confusion avec certaines broncho-pneumonies à résolution traînante. La gangrène pulmonaire, les kystes hydatiques du poumon, la pleurésie interlobaire, la dilatation des bronches, le pneumothorax sont capables de produire des signes cavitaires comme la tuberculose. La pneumonie caséuse avec ses caractères de pneumonie franche ou de broncho-pneumonie, la granulie avec ses signes de bronchite capillaire peuvent être méconnues dans leur véritable origine.

Les crachats des tuberculeux n'ont pas de caractères spéciaux. Ils peuvent avoir des aspects très divers, être rares ou abondants, liquides ou visqueux, grisâtres, jaunâtres ou verdâtres, muqueux ou plus ou moins purulents.

Aussi la découverte du bacille de Koch a-t-elle jeté une grande lumière sur l'étiologie des accidents que la clinique était quelquefois incapable de préciser d'une façon absolue.

Un grand nombre de procédés ont été préconisés pour rendre pratique et facile la recherche du bacille de Koch dans les crachats.

Ces procédés peuvent se réduire à deux types principaux : les procédés par examen direct et les procédés par sédimentation spontanée ou provoquée.

1° PROCÉDÉS D'EXAMEN DIRECT

Les crachats étant reçus dans un récipient stérile, une petite parcelle purulente est recueillie au moyen d'un fil de platine et déposée sur une lame ; au moyen d'une autre lame on écrase le crachat et on l'étale ainsi en couche mince. On obtient de la sorte deux préparations qu'on laisse sécher à l'air libre et qu'on fixe ensuite par la chaleur en les passant sur la flamme d'un bec Bunsen. On colore à chaud par la liqueur de Ziehl ; on décolore par l'acide azotique au tiers et le fond est recolore dans une solution de bleu de méthylène.

Dans ces conditions, les bacilles apparaissent en rouge et les autres microbes sont bleus.

2° PROCÉDÉS PAR SÉDIMENTATION

A la première période de la tuberculose, la toux manque très souvent et lorsqu'elle existe elle est sèche et ne s'accompagne que d'une rare expectoration muqueuse, sans trace de matière purulente.

Aussi doit-on, pour avoir le maximum de chances de rencontrer le bacille de Koch, opérer sur la plus grande masse possible de crachats.

C'est ce que permettent de réaliser les procédés par sédimentation. Celle-ci est précédée d'une préparation spéciale des crachats, et cette opération porte le nom d'homogénéisation.

Biedert (1886) prend 15 centimètres cubes de crachats auxquels il ajoute 30 centimètres cubes d'eau, puis huit à dix

gouttes de lessive de soude, puis encore 400 centimètres cubes d'eau. Il chauffe à ébullition dans une capsule jusqu'à ce que le liquide soit devenu fluide et homogène. On laisse déposer quarante-huit heures dans un verre conique, on décante et on fait des préparations avec le sédiment.

Bezançon (1903), après avoir homogénéisé les crachats par la soude, en provoque la sédimentation par la centrifugation. Mais il recommande de diluer beaucoup les crachats, car dans les liquides trop denses la sédimentation ne se fait pas. Il ramène d'ordinaire le liquide au voisinage de 1.000 centimètres cubes.

Les substances chimiques capables de réaliser l'homogénéisation sont nombreuses; tous les alcalis préalablement dosés conviennent bien. Kühne (1890) préconise le borax qui rend les crachats moins visqueux, n'altère pas la forme du bacille de Koch. Cette substance ne liquéfie pas aussi bien que la soude. On ajoute parties égales de crachats et d'une solution concentrée de borax et d'acide borique et on agite bien le mélange dans un flacon.

Moeller dilue dans un flacon les crachats avec un peu d'eau et les agite vigoureusement avec des plombs de chasse de fort calibre. Après en avoir séparé les plombs, on centrifuge.

Certains auteurs proposent de substituer aux réactifs chimiques des substances physiologiques, afin de provoquer la digestion. Spengler (1895) verse parties égales de crachats et d'eau tiède alcalinisée avec un peu de soude et additionnée de 0 gr. 10 à 1 gramme de pancréatine, et il met le mélange à l'étuve. Après deux ou trois heures de contact, il ajoute 0 gr. 10 à 1 gramme d'acide phénique cristallisé pour empêcher la putréfaction. De douze à vingt-quatre heures après, il est possible de recueillir un sédiment pour en faire des préparations.

Jousset (1903) digère préalablement les crachats au moyen d'un suc gastrique artificiel fluoré avant de les soumettre à la centrifugation.

Que la solubilisation des éléments du crachat soit réalisée par les réactifs chimiques ou physiologiques, que la sédimentation soit obtenue spontanément ou mécaniquement au moyen du centrifugeur, ces procédés permettent d'augmenter dans une très grande mesure les chances de trouver des bacilles de Koch dans un petit dépôt qui représente un grand volume de la substance à examiner.

3° PROCÉDÉ CHORISIMÉTRIQUE PER ASCENSUM

Les procédés que nous venons d'étudier présentent sur le procédé direct l'avantage d'être plus précis et d'augmenter les chances de succès. Malheureusement, les procédés de sédimentation spontanée sont un peu longs, puisqu'ils exigent de douze à quarante-huit heures de repos. Les procédés par sédimentation mécanique nécessitent l'emploi de centrifugeurs très puissants et encore faut-il diluer beaucoup les crachats.

Nous allons décrire notre procédé chorisimétrique; celui-ci nous paraît échapper aux reproches précédents, car il est rapide et ne nécessite pas une dilution exagérée des crachats que l'on veut examiner. Enfin, il ne nécessite pas l'emploi du centrifugeur et donne cependant d'aussi bons résultats que les méthodes qui ont recours à cet instrument.

RÉACTIFS NÉCESSAIRES. — 1° Lessive de soude; 2° Acide acétique; 3° Ether sulfurique.

INSTRUMENTS. — 1° Capsule en porcelaine; 2° Entonnoir à décantation bouché à l'émeri en haut et à robinet.

A) *Premier temps.* — Il consiste dans l'homogénéisation

Crachats.....	10 cc.
Eau distillée.....	100 cc.
Lessive de soude.....	X gouttes

On porte le mélange à l'ébullition en ayant soin d'agiter constamment au moyen d'une baguette de verre. On s'arrête

au moment où le liquide obtenu est homogène et cesse d'être filant.

B) Deuxième temps. — Le liquide précédent, préalablement refroidi, est versé dans la boule de l'entonnoir à décantation, après s'être assuré que le robinet inférieur est fermé. On ajoute de l'eau distillée, filtrée et stérilisée, de telle façon que la masse totale occupe environ les trois quarts du volume de la boule. A ce moment, on ajoute 10 centimètres cubes d'éther et quelques gouttes d'acide acétique. Le bouchon supérieur étant bien assujéti, on enlève l'appareil de son support et on l'agite vigoureusement en le retournant à plusieurs reprises. Il se forme des gaz provenant, sans doute, de l'hydrolyse des matières albuminoïdes, et, parmi ces gaz, de l'hydrogène sulfuré. Ceux-ci augmentent la pression intérieure, de telle sorte que le bouchon pourrait sauter s'il n'était maintenu par l'index de la main droite pendant le temps que dure l'agitation. Et, dans ces conditions, on observerait la formation d'une mousse abondante se projetant hors de l'appareil. Nous insistons sur cet incident, car il est facile de le prévenir. Pour cela, il suffit de faire couler le jet d'un robinet sur les parois extérieures du verre et de déboucher ensuite progressivement l'appareil.



Ces particularités étant observées, le coagulum produit par l'action de l'acide acétique est entraîné avec une vitesse assez considérable (quelques secondes à une minute) à la partie supérieure, clarifiant à peu près complètement le liquide primitivement opalescent.

Ce deuxième temps a pour but de diviser le liquide à l'extrême au moyen de l'éther. En effet, l'agitation directe du liquide obtenu dans le premier temps est très difficile à cause du caractère visqueux de ce liquide. L'addition d'acide acétique supprime cet inconvénient et l'agitation s'accompagne d'un bruissement tout à fait particulier lorsque la quantité d'acide acétique est suffisante. Ce caractère du choc sur les

parois, la mobilité très grande, la clarification rapide de la couche inférieure indiqueront une dose appropriée de l'acide acétique. On pourrait également, dans le même but, se servir d'indicateurs colorés employés en acidimétrie : la phtaléine du phénol, par exemple, mais il faudrait auparavant étudier l'action de ces substances sur les propriétés colorantes du bacille de Koch. Mais les caractères que nous avons précédemment indiqués suffisent grandement pour cette appréciation et, d'autre part, un excès d'acidité ou d'alcalinité ne saurait nuire en rien au résultat final, à cause de la rapidité de l'opération.

C) Troisième temps. — Le coagulum est monté à la partie supérieure. A ce moment, il faut redissoudre ces matières albuminoïdes au moyen de la lessive de soude. Il convient d'ajouter progressivement ce liquide et d'agiter l'appareil après chaque addition. Un excès d'éther sera utile et facilitera le mélange. On cessera d'ajouter de la soude lorsque toute trace d'opalescence ou de coagulum aura disparu. Dès lors, on replacera l'appareil sur son support. En regardant de près les phénomènes qui se passent au sein des liquides, on verra que des gouttelettes d'éther et des bulles font continuellement leur ascension progressive. Peu à peu, la partie inférieure se clarifie tandis que la couche supérieure est opalescente. Cette opalescence diminue petit à petit, l'éther se rassemble et sa transparence parfaite contraste avec une sorte d'anneau qui paraît marquer son union avec la solution alcaline. Cet anneau se réduit de plus en plus et constitue bientôt comme une mince pellicule.

La séparation des bacilles de Koch d'avec le milieu qui les tenait en suspension est effectuée. Cette séparation peut être activée dans une très large mesure en chauffant les parois de l'appareil avec de l'eau à 40°, ou bien par addition d'une certaine quantité d'eau ne dépassant pas une température de 35°, ou bien encoré, plus simplement, en promenant la flamme du bec Bunsen sur la partie effilée de l'appareil.

D) Quatrième temps. — Un quart d'heure environ après

avoir placé l'appareil sur son support, les bacilles sont, tous, dans la pellicule et il ne reste plus qu'à recueillir celle-ci.

Pour cela, il suffit de décanter le liquide sous-jacent. Il faudra observer certaines précautions :

1^o Enlever le bouchon supérieur et le remplacer par un tampon de coton peu dense ne faisant pas office de fermeture hermétique pour l'air.

2^o Ouvrir en grand le robinet inférieur, de façon que le liquide occupe toute la tubulure sans interposition de bulle d'air. Celle-ci gênerait légèrement l'écoulement régulier des dernières gouttes de l'émulsion contenant les bacilles.

Ces précautions observées, on modère l'écoulement. L'éther surnageant, qui doit toujours être en grand excès, s'oppose à l'adhérence des particules solides aux parois de l'appareil et opère à mesure qu'il descend une sorte de drainage de ces parois.

L'anneau est arrivé à 1 centimètre du robinet; on ferme celui-ci et on prépare les lames destinées à le recevoir. Si l'on ne possède pas bien le maniement de l'appareil, il est plus prudent de recevoir l'anneau dans un petit tube stérilisé. Dans le cas contraire, voici le manuel opératoire : On ouvre à peine le robinet pour que le liquide tombe goutte à goutte et très lentement. Quand l'opalescence de l'émulsion ne sera plus qu'à 1 millimètre de l'orifice, on présentera les lames au bec du tube et on recueillera les gouttes séparément sur une lame ou plusieurs gouttes sur la même lame. L'opération ne présente aucune difficulté et quelques essais avec de l'eau donneront le tour de main nécessaire.

Les lames séchées à l'air libre, à l'abri de la poussière, ou dans une étuve à 38° montrent à l'endroit où les gouttes ont été déposées une trace blanchâtre d'apparence cristalline. C'est la soude que l'évaporation de l'eau a mise en liberté. Pour avoir des préparations d'une très grande finesse il faut éviter une trop grande quantité de ce réactif. Pour cela, on décantera la majeure partie de la solution alcaline et on la remplacera par une égale quantité d'eau filtrée et stérilisée.

On agitera de nouveau et on laissera reposer pendant un quart d'heure. On recommencera la décantation et, cette fois, on recevra les dernières gouttes sur les lames. Les préparations séchées comme il est dit plus haut sont fixées à l'alcool-éther à parties égales pendant quelques minutes, puis à la flamme du bec Bunsen, colorées par la liqueur de Ziehl, décolorées par l'acide nitrique au tiers et recolorées par une solution de bleu de méthylène. Ces préparations ainsi obtenues sont merveilleusement claires. Quand l'homogénéisation et la dilution ont été bien pratiquées, on n'aperçoit que quelques fragments de substance amorphe très rares qui ont pris la coloration bleue et qui aident à la mise au point. Les bacilles de Koch sont les seuls éléments microbiens que l'on y rencontre. Aucun de ceux que l'examen d'un frottis avait permis de voir (pneumocoques, tétragènes, microcoques, etc.) ne se retrouve plus ici. Seul, le bacille de Koch paraît admirablement coloré en rouge. Il a cependant pris une apparence granuleuse et moniliforme, sous l'influence de la lessive de soude. Il présente à un fort grossissement (1500 diamètres) de 3 à 6 granulations séparées par des espaces clairs extrêmement petits. Enfin, le nombre des bacilles de chaque préparation est quelquefois extraordinaire. Nous avons examiné des gouttelettes qui contenaient jusqu'à 500 bacilles par champ microscopique (objectif Zeiss immersion homogène 1,30; oculaire 8). L'absence de toute matière organique colorée en bleu donnait l'illusion d'une culture.

Avant d'étudier en détail les avantages de notre procédé, nous allons, en un tableau, donner un résumé des opérations.

RÉSUMÉ

- 1° Homogénéisation des crachats par la lessive de soude.
- 2° Insolubilisation des matières albuminoïdes par l'acide acétique et agitation de ces matières au moyen de l'éther dans un entonnoir à décantation
- 3° Solubilisation du coagulum par la lessive de soude et agitation.

4° Décantation du liquide alcalin, séparation et fixation de l'anneau.

Ces diverses opérations, si longues à décrire dans leurs détails, s'effectuent avec une grande rapidité.

1° Homogénéisation.....	5 min. environ
2° Insolubilisation après refroidissement par l'eau filtrée...	1 —
3° Solubilisation et ascension des bacilles.....	15 —
4° Décantation et préparations..	5 —
Total.....	26 min. environ

Le procédé d'examen des frottis est plus rapide que tous les autres lorsque les bacilles de Koch se trouvent en grande abondance dans les crachats. Mais il n'en est pas de même dans tous les cas; il devient alors nécessaire d'effectuer un grand nombre de frottis, et si la parcelle de crachats qui a servi à les faire a été mal choisie, on peut être amené à conclure à un résultat négatif. Le temps nécessaire à l'examen est supérieur à la durée d'une demi-heure. Par conséquent, si l'examen rapide d'un frottis ne montre pas des bacilles, on a tout intérêt à employer un procédé permettant de retrouver tous ceux qui sont dans un crachat donné.

Notre méthode, par sa rapidité, sa facilité d'exécution et l'outillage rudimentaire qu'elle réclame rendrait dans ces cas douteux de réels services.

Elle est extrêmement sensible, puisque l'anneau contient tous les bacilles, ce dont il est facile de s'assurer par la centrifugation du liquide décanté.

La comparaison volumétrique entre les liquides primitifs et le résidu final à examiner va nous donner une idée approximative de l'augmentation des chances de trouver les bacilles dans les crachats. Pour 50 centimètres cubes de crachats, le résidu final est d'environ 1/10 de centimètre cube en tenant compte de la solution alcaline qui le tient en suspension. On voit que les probabilités de réussite sont 500 fois

plus grandes après le traitement par ce procédé que si on avait recherché les bacilles dans les crachats eux-mêmes.

On a cherché à tirer de l'étude des crachats tuberculeux, non seulement un moyen de diagnostic mais encore un moyen de pronostic basé sur le nombre plus ou moins considérable de bacilles de Koch que renferment les crachats. Différentes échelles, parmi lesquelles celles de Gafky, de Denœyer, ont été établies d'après le nombre de bacilles que l'on peut observer dans un champ microscopique à un grossissement déterminé.

Récemment, Piéry et Mandoul (1905) ont étudié la valeur pratique de la recherche des variations morphologiques et numériques du bacille de Koch dans le diagnostic, le pronostic et le traitement de la tuberculose pulmonaire. Ces auteurs distinguent six formes différentes. En donnant les chiffres 1, 2, 3, 4 aux quatre premières formes et en les rangeant suivant l'ordre de prédominance, on obtient une formule que l'on complète en indiquant à droite le nombre global des bacilles; cette formule peut être traduite sur un graphique. En pratiquant plusieurs examens au cours d'une évolution tuberculeuse, et en faisant le graphique, on a deux courbes: celle du nombre et la courbe morphologique. Cette courbe conduirait à des présomptions qui découlent de l'évolution et de la forme clinique ainsi précisée.

La constitution des échelles numériques donne lieu à des critiques. En effet, l'échelle de Denœyer (de Davos) comporte dix catégories.

Le n° 1 correspond à des cas où l'on trouve de un à quatre bacilles dans toute la préparation.

Le n° 2 à des cas où l'on trouve un bacille sur plusieurs champs.

Le n° 3 à des cas où l'on trouve un bacille dans chaque champ, etc.

Les erreurs commises dans des appréciations faites au moyen de cette technique peuvent être considérables. Les crachats du même malade préparés par deux opérateurs

différents donnent des résultats dissemblables. C'est peut-être pour cette raison que Gafky a noté des écarts quotidiens dans le nombre des bacilles qui variaient d'un jour à l'autre entre 5 et 150 bacilles par champ microscopique.

Pour observer les variations dans le nombre des bacilles, il faudrait savoir combien le malade en expulse dans les vingt-quatre heures. Notre procédé chorismétrique permettrait d'arriver très rapidement à une grande précision. Voici comment il faudrait procéder : La masse totale des crachats des vingt-quatre heures serait homogénéisée et introduite en totalité ou par fractions dans l'entonnoir à décantation. L'anneau ou les différents anneaux seraient recueillis dans un flacon gradué jusqu'à 50 centimètres cubes. On leur ajouterait de l'eau filtrée stérilisée jusqu'à la division 50. Au moyen du compte-gouttes normal, on numère le nombre de gouttes nécessaires pour faire un volume de 1 centimètre cube. On émulsionne fortement les bacilles en agitant le flacon qui les renferme. Au moyen du compte-gouttes, on dépose sur quatre lames une goutte de cette émulsion. Ces gouttes sont égales comme poids et comme volume. Supposons que les préparations de ces gouttes examinées sur toute leur surface donnent respectivement le nombre suivant de bacilles :

Lame n° 1	100
Lame n° 2	125
Lame n° 3	90
Lame n° 4	110

La moyenne des bacilles par goutte sera de 106.

Supposons que dix-huit gouttes représentent 1 centimètre cube. Le nombre de bacilles contenu dans 1 centimètre cube sera

$$106 \times 18 = 1908$$

et, par suite, le chiffre total des bacilles des vingt-heures sera

$$1908 \times 50 = 95.400 \text{ bacilles}$$

Telle serait, à notre avis, la seule façon véritablement scientifique de procéder pour établir l'échelle numérique.

La morphologie des bacilles a donné à plusieurs auteurs, parmi lesquels Piery et Mandoul (1905), Chauvain (1905), des indications pronostiques. Une technique toujours identique donnera vraisemblablement des résultats concordants sur cette morphologie. Même traités par la lessive de soude, des bacilles rentrant dans la catégorie des homogènes, des maciliformes, des moniliformes, offriront des caractères particuliers. Le principal est de définir, une fois pour toutes, les caractères distinctifs de chaque espèce.

Malgré tout, il ne nous semble pas que ni le nombre ni la forme des bacilles puissent donner des éléments absolument certains pour le pronostic de l'évolution de la maladie. Car des bacilles moniliformes appartenant à deux sujets différents n'auront pas la même façon de réagir sur leur organisme et, d'autre part, le bacille de Koch n'est pas à l'état de pureté dans les lésions comme dans les tuberculoses expérimentales du cobaye, par exemple, et il faudrait chercher parallèlement à la morphologie et au nombre des bacilles tuberculeux ceux des autres microbes ainsi que leur virulence.

Quoi qu'il en soit, le procédé chorisimétrique per ascensum, outre la simplification qu'il apporte à la technique de l'examen des crachats, permet d'établir une formule numérique rigoureusement exacte et de classer les bacilles dans plusieurs familles, suivant leur forme. Il pourrait encore offrir l'avantage de fournir des bacilles de Koch à l'état de pureté et de permettre ainsi l'étude de leurs propriétés chimiques, de leur toxicité, etc.

CHAPITRE III

Mécanisme du procédé chorisimétrique

J. Auclair (1897), étudiant les produits solubles extraits du corps des bacilles de Koch au moyen de divers dissolvants des corps gras (chloroforme, éther), avait remarqué le phénomène suivant : Lorsque, après avoir distillé la plus grande partie du bouillon, on fait agir sur le résidu de la distillation de l'éther sulfurique en assez grande quantité et qu'on agite, on voit l'éther surnageant devenir opalescent et comme laiteux. Si on décante cet éther et qu'on le remplace par une nouvelle quantité de ce même produit, l'éther devient opalescent, mais d'une façon moins accusée. Si l'on épuise ainsi ce reliquat par des doses successives du réactif, il arrive un moment où l'éther surnageant est tout à fait clair. L'auteur attribue ce dédoublement des bacilles à l'action de l'éther sur les bacilles préalablement chauffés pendant cinq minutes au moins et, se basant sur leur différence de densité, il les classe en deux catégories : bacilles légers et bacilles lourds, suivant qu'ils flottent dans l'éther ou qu'ils tombent au fond de ce liquide.

La différence de densité seule ne paraît pas être la cause de l'opalescence observée par Auclair dans les liquides éthérés. Les bacilles contenus dans les résidus du bouillon de culture pouvaient être imprégnés des substances de ce bouillon et, ainsi, réagir vis-à-vis de l'éther d'une façon plus complexe.

Jousset (1901), dans son travail sur les *Humeurs opales-*

centes de l'organisme, montre que la substance opalescente est due à plusieurs sortes de corps :

a) Des matières grasses, cholestérine, savons, acides gras, lécithines.

b) A des nucléo-albumines.

c) Aux deux groupes réunis.

Pour démontrer ces faits, il pratique l'épuisement du liquide opalescent au moyen du liquide d'Adam qui est ainsi constitué :

A)	{ Alcool à 90°.....	833 cc.
	{ Ammoniaque du Codex.....	30 cc.
	{ Eau distillée.....	1 litre.
B) Éther pur à 65°.....		
Mélanger { 100 volumes de A.		
{ 100 volumes de B.		

Si le liquide ainsi traité se clarifie, il s'agit d'une opalescence de nature grasseuse. S'il reste opalescent, il n'est pas de nature grasseuse ou bien il contient des nucléo-albumines. En effet, en ajoutant de l'acide acétique ou, à doses moindres, de l'acide chlorhydrique on obtient la clarification.

Jousset n'a étudié que le côté chimique et clinique des liquides ainsi traités par le liquide éthéro-alcoolique et ses recherches histo-chimiques n'ont porté que sur les substances capables de produire l'opalescence.

Pour expliquer le mécanisme de notre procédé chorismétrique nous adopterons l'hypothèse la plus vraisemblable de l'ascension des microbes par émulsion.

Quand deux liquides ne sont pas solubles l'un dans l'autre, l'agitation peut diviser un des liquides en gouttelettes au sein de l'autre. Ces gouttelettes restent en suspension dans le liquide pendant un temps variable : il y a émulsion. Le liquide qui est ainsi transformé en gouttelettes est celui dont la tension superficielle est la plus faible : ainsi l'éther dans l'eau. Ces gouttelettes constitueront une émulsion plus ou

moins persistante suivant la nature des liquides, mais au bout d'un certain temps les sphères liquides soumises à l'action de la pesanteur et à l'attraction qu'elles exercent les unes sur les autres se rassemblent et forment un liquide qui occupe, suivant la densité, la partie supérieure ou inférieure. La force avec laquelle ces gouttelettes s'élèvent ou se précipitent est d'autant plus grande que la différence de densité est plus élevée. La vitesse est plus ou moins grande suivant la résistance du liquide à leur passage. Cette résistance que les physiiciens ont appelée viscosité augmente, puisqu'il s'agit d'un frottement, avec le poids, le volume; elle diminue au contraire sous l'influence de la chaleur qui tend à diminuer les forces attractives en élargissant l'intervalle des molécules.

La présence d'un corps étranger dans un milieu fluide modifie l'équilibre moléculaire de ce milieu; il se fait autour de ces éléments étrangers un groupement plus serré des molécules et ces éléments vont être entraînés par le liquide émulsionné. Claude Martin (1904) pense que c'est ainsi qu'on arrive à épuiser par l'éther les albumoses d'une urine, à clarifier le vin. C'est aussi de cette manière que les bulles du pot au feu entraînent l'albumine sous forme d'écume coagulable. Il y a donc entraînement moléculaire par émulsion.

De plus, les substances ainsi isolées par l'éther peuvent réagir sur ce liquide. Cette réaction est très évidente dans certaines urines contenant des matières albuminoïdes non coagulables par la chaleur; celles-ci entraînées par l'éther font prise avec lui à la partie supérieure et parfois constituent une sorte de bouchon s'opposant au passage du liquide plus dense, si l'on vient à renverser le tube dans lequel il s'est formé.

Ainsi doit très vraisemblablement s'expliquer l'ascension des bacilles de Koch dans notre procédé. Ces bacilles jouent dans le fluide qu'est le crachat dilué, par exemple, le rôle de corps étrangers modifiant l'équilibre moléculaire. L'éther dont la tension superficielle est inférieure à celle de l'eau est le liquide émulsionné. La différence considérable de sa

densité (0,724 à + 15° pour l'éther du commerce rectifié) avec celle du liquide émulsionnant, explique la force et la vitesse avec lesquelles l'éther gagne la partie supérieure du liquide émulsionnant, entraînant les corps étrangers que sont les bacilles et cela plus rapidement encore si l'on chauffe légèrement le liquide inférieur sans toutefois dépasser 35°, afin d'éviter l'ébullition de l'éther. On a ainsi diminué la viscosité du liquide émulsionnant et, par suite, augmenté la vitesse ascensionnelle de l'éther, cette vitesse étant fonction de la résistance du liquide à son passage.

L'argument suivant nous paraît donner encore plus de force à cette hypothèse d'émulsion par l'éther.

Le tube étant ouvert à la partie supérieure, on laisse s'opérer l'évaporation de l'éther. Il suffira, dès ce moment, du plus léger mouvement, du moindre choc, pour dissocier la pellicule et la faire tomber au fond du tube. Souvent même, dans ces conditions, elle tombe spontanément.

Il ne s'agit donc pas d'une simple question de densité pour expliquer l'ascension des bacilles. Celle-ci est le résultat d'un phénomène physico-chimique.

CHAPITRE IV

Recherche du bacille de Koch dans les matières fécales

Les fèces peuvent contenir des bacilles de diverses origines :

a) Alimentaire, si le sujet a ingéré des aliments provenant de bovidés tuberculeux et en particulier du lait ;

b) Pulmonaire, quand le sujet est porteur d'une lésion de l'appareil respiratoire et déglutit ses crachats ;

c) Intestinale, dans les cas d'ulcération de cette muqueuse.

Lepage (1906) a particulièrement bien étudié la question de la recherche du bacille de Koch dans les matières fécales au moyen de divers procédés : examen direct, procédé de Strassbürger, procédé de Nabias.

1° PROCÉDÉ DIRECT

Il consiste dans la coloration de frottis obtenus par l'étalement d'une particule solide prise en un point quelconque au moyen d'un fil de platine. Les préparations doivent sécher à l'air libre et être fixées par un mélange à parties égales d'alcool et d'éther pendant plusieurs minutes. La coloration de la lame se fait suivant la méthode ordinaire de Ziehl avec décoloration énergique par l'acide azotique au tiers et recoloration du fond par une solution de bleu de méthylène. Plusieurs microbes résistent à la décoloration et apparaissent rouges. Ce sont : les bacilles de Koch, des bâtonnets courts et trapus qui sont des acido-résistants, des corpuscules uni-

formément colorés en rouge et dont le diamètre varie entre 1 et 2 μ , des corps en flamme de bougie.

Dans tous les examens ainsi pratiqués, Lepage a trouvé dans les cas positifs des bacilles très rares (un bacille sur six à sept préparations).

2° PROCÉDÉ DE STRASSBÜRGER

Il consiste à prendre une petite quantité de fèces de la grosseur d'un pois que l'on dilue avec quelques centimètres cubes d'eau. On centrifuge le tout pendant trente secondes environ ; on sépare ainsi grossièrement les parties les plus volumineuses ; on recueille le liquide qui surnage, on le dilue avec deux parties d'alcool à 96° et on centrifuge à nouveau pendant trente secondes.

Les bactéries et les fins détritits sont alors groupés au fond du tube et forment un dépôt. La partie supérieure liquide et limpide est rejetée et c'est avec le sédiment que l'on fait les préparations.

Cruchet et Lepage (1905) ont obtenu, grâce à ce procédé, un nombre de bacilles qui peut être évalué approximativement à un ou deux par préparation.

3° PROCÉDÉ CHORISIMÉTRIQUE PER ASCENSUM

Au Congrès de la tuberculose (1905), M. le Professeur de Nabias a communiqué un procédé chorisimétrique de recherche du bacille de Koch dans les matières fécales.

Les fèces destinées à l'examen doivent être recueillies dans un flacon à large ouverture, bouché à l'émeri et dans lequel on peut ajouter aussitôt certaines substances destinées à marquer l'odeur fécaloïde et, en particulier, quelques centimètres cubes d'acétate d'amyle ou, à son défaut, de l'un des éthers acétique, nitrique, ou sulfurique. Toutes ces substances ne nuisent pas à la coloration du bacille de Koch.

Voici, d'ailleurs, la description du procédé par l'auteur :

« Délayer les matières fécales en assez forte quantité dans un récipient, une capsule par exemple, avec de l'alcool à 40° jusqu'à désagrégation complète. L'alcool peut être plus concentré si les matières sont liquides. Ajouter une légère couche d'éther. Remuer un instant. Laisser reposer. La couche d'éther surnage à ce degré de concentration alcoolique. D'autre part, dans son mouvement ascensionnel pour venir se dissoudre dans l'éther, l'alcool contribue à entraîner vers la surface les particules les plus légères, notamment les microbes. L'éther s'évapore assez rapidement. Un voile se forme, en même temps, comme à la surface d'une eau stagnante. Ce voile est presque exclusivement constitué par des microbes.

» Si le bacille de Koch se trouve dans les selles, il se trouve sûrement là. On fait dès lors un frottis avec ce voile, on fixe par la chaleur et on colore par la méthode de Ziehl. »

Les frottis faits avec les parties moyennes et les parties inférieures ont toujours donné des résultats négatifs.

Les bacilles sont répartis dans le voile d'une façon inégale, ce qui justifie l'indication de recueillir le voile en totalité soit au moyen d'une aiguille lancéolée, d'un scalpel ou d'une pipette; mais il peut être préférable, pour prélever la pelticule, de se servir d'une lamelle maintenue avec une pince.

Il n'est pas utile d'éclaircir la préparation; la fixation par la chaleur est suffisante. Les préparations sont, en effet, d'une netteté parfaite et constituées uniquement par des microbes. Quand les matières grasses sont très abondantes on observe des îlots sur lesquels ont très peu agi les matières colorantes et qui emprisonnent des espèces microbiennes.

Avec le procédé de Nabias, Lepage observe environ deux à trois bacilles par préparation.

4° VALEUR DES DIFFÉRENTS PROCÉDÉS

Lepage a étudié, d'une façon très complète et dans un grand nombre de cas, la présence du bacille de Koch dans

les selles, grâce aux trois procédés que nous venons d'indiquer.

Le procédé direct, bien qu'il présente l'avantage d'être rapide et d'éviter toute manipulation antérieure à la coloration, porte évidemment sur une partie trop minime de fèces.

Lepage adresse au procédé de Strassbürger le reproche de nécessiter de nombreuses manipulations et surtout celui de ne pas déceler la totalité des bacilles, si l'on s'en tient à l'examen du second sédiment. En effet, trois fois sur quatre cas de selles examinées par ce procédé, le dépôt de la première centrifugation contenait des bacilles de Koch quoique en plus petit nombre que celui de la deuxième centrifugation.

Le procédé de M. le Professeur de Nabias échappe à ces critiques. En effet, il fait porter la recherche sur une masse considérable de fèces, sa technique est très simple et ne nécessite pas l'emploi du centrifugeur. Il permet, en outre, en raison de la rapidité de la manipulation, d'examiner la masse totale des fèces, surtout quand celles-ci sont diarrhéiques, car dans ce cas la désagrégation est toute faite, et ainsi de pratiquer un examen complet. Enfin grâce à l'ascension des diverses bactéries et à la netteté du champ il permet de saisir l'espèce prédominante.

Remarques. — Les nombreuses observations rapportées par Lepage montrent d'une façon absolument certaine la supériorité du procédé de Nabias, c'est-à-dire du procédé chorisométrique per ascensum.

Cependant, dans les cas où l'on bornerait sa recherche au bacille de Koch et dans ceux où se trouve une grande abondance de matières grasses, il serait peut-être avantageux de pratiquer l'homogénéisation préalable au moyen de la lessive de soude, comme pour les crachats. De cette façon, les matières grasses ne se présenteraient pas sous forme d'ilots emprisonnant des microbes et empêchant les réactifs d'agir avec toute l'énergie nécessaire.

Enfin la décantation du liquide sous-jacent à l'éther se

ferait très facilement, grâce au tube à boule, et le voile serait ainsi recueilli dans sa totalité et examiné sur le minimum de surface possible.

Le procédé chorisimétrique, tel que nous l'avons décrit (*Gaz. hebdomadaire des Sciences médicales de Bordeaux*, 1902) pour les crachats, avec ou sans la modification de Nabias, pour les selles, facilite d'une façon très considérable, grâce à sa technique simple, l'examen microbiologique des selles. Il permettra d'y retrouver le bacille de Koch, quelle qu'en soit l'origine.

Le bacille d'origine alimentaire sera éliminé par une surveillance rigoureuse des aliments. Les bacilles d'origine pulmonaire et intestinale n'ont pas de caractères spéciaux permettant de préciser cette origine et c'est à l'aide des données cliniques que l'affection sera localisée.

Chez les enfants, en particulier, qui ne crachent pas et déglutissent leurs crachats, l'examen des selles remplacera avantageusement la recherche du bacille de Koch dans les mucosités de l'arrière-gorge ou dans les crachats extraits de l'estomac (Bacilloscopie de H. Meunier, 1898).

CHAPITRE V

Recherche du bacille de Koch dans les liquides spontanément coagulables (sang, liquide pleurétique, liquide d'ascite, sérosité articulaire, liquide d'hydrocèle)

Quand on recueille du sang au sortir d'un vaisseau, il ne tarde pas à perdre sa limpidité; il se prend en masse au bout d'un temps variable (depuis quelques minutes jusqu'à une demi-heure et plus). Le caillot, d'abord homogène, se rétracte peu à peu en laissant exsuder un liquide albumineux jaunâtre, le sérum. A la longue, le caillot devient dur, élastique, s'exprime comme une éponge, tandis que le sérum exsudé augmente, au point de baigner complètement le caillot. Dans ce phénomène, une matière albuminoïde: la substance fibrinogénique, s'est coagulée, emprisonnant les globules; le reste du plasma, privé de son fibrinogène, a constitué le sérum.

Les cavités séreuses pleurale, péricardique, péritonéale, vaginale ne contiennent normalement qu'une très faible quantité de liquide lymphatique. Mais, sous l'influence des causes pathologiques, le plasma lymphatique peut s'y accumuler en plus ou moins grande quantité, constituant ainsi un transsudat. La quantité du liquide transsudé peut être considérable et atteindre dans certaines cavités séreuses plusieurs litres.

D'une façon générale, les transsudats qui n'ont pas une origine inflammatoire ne coagulent pas spontanément. Ils ne contiennent, en effet, que fort peu d'éléments figurés. Les

transsudats inflammatoires coagulent, au contraire, spontanément lorsqu'ils sont retirés de la cavité séreuse: ils sont, en effet, riches en éléments anatomiques.

Le liquide d'ascite ne coagule pas spontanément lorsque l'ascite est consécutive à un trouble de la circulation, à une lésion cardiaque ou à une lésion hépatique, par exemple. Il coagule spontanément lorsque l'ascite se produit sous l'influence d'une péritonite; le liquide d'ascite contient dans ce cas de nombreux globules blancs, et dans les cas de lésions néoplasiques, il contient de nombreuses cellules cancéreuses.

On peut faire les mêmes remarques pour les liquides de la cavité pleurale. Dans l'hydrothorax simple, le liquide non spontanément coagulable est pauvre en substances albuminoïdes. Dans la pleurésie inflammatoire, le liquide est riche en éléments figurés et coagule spontanément.

Le liquide d'hydrocèle n'est pas coagulable généralement, à moins d'avoir été souillé pendant la ponction par quelques gouttes de sang.

Les recherches entreprises sur la virulence des liquides séro-fibrineux de la pleurésie ont montré que l'on a d'autant plus de chances de tuberculiser un cobaye qu'on a empêché le coagulum de se former ou que, si la coagulation s'est faite déjà, on inocule le caillot avec le liquide (Chauflard et Gombault, Netter, Le Damany) et non le liquide seul. Il semble donc que ce soit sur le caillot que doivent porter les recherches.

La recherche directe du bacille dans le caillot est possible si l'on redissout ce caillot et si on soumet le liquide obtenu à la centrifugation. Deux méthodes ont été préconisées:

1° La digestion du caillot par le suc gastrique artificiel (Jousset, 1903);

2° L'homogénéisation du caillot par la lessive de soude (Bezançon, Philibert et Griffon, 1903).

Technique de Jousset (inoscopie), d'après Bezançon. — On recueille le liquide en prenant les précautions les plus rigoureuses d'asepsie. On laisse le liquide au repos jusqu'à ce que le coagulum soit formé; dès que la coagulation est achevée,

on décante le liquide en le filtrant sur une compresse stérilisée et bouillie dans de l'eau alcaline. On exprime la compresse pour chasser le sérum et, pour se débarrasser de toute trace de celui-ci, on le lave à l'eau distillée.

On fait agir ensuite sur le caillot le suc gastrique artificiel suivant :

Pepsine en paillettes, titre 50 du Codex. . .	2 grammes.
Fluorure de sodium	3 —
Acide chlorhydrique à 22° Réaumur.	} à 10 ce.
Glycérine pure	
Eau distillée	4 litre

Le caillot est mis dans un flacon de 50 centimètres cubes, à large embouchure ; on y verse 20 à 30 centimètres cubes de suc gastrique artificiel. On porte à l'étuve à 38°. La digestion est terminée en deux ou trois heures si l'on a soin d'agiter de temps en temps le flacon ; la digestion se fait plus rapidement si celui-ci a été placé dans une étuve à 50°. On centrifuge le liquide, on décante et on prélève une parcelle du dépôt obtenu par centrifugation. On l'étale, on le fixe et on recherche le bacille de Koch par les procédés usuels.

Technique de Bezançon, Griffon et Philibert. — Ces auteurs ont appliqué au caillot la méthode déjà préconisée par Biedert pour l'homogénéisation des crachats.

Pour le sang, ils broient le caillot dans un mortier dépoli et on l'homogénéise en ajoutant 20 centimètres cubes d'eau distillée et cinq à dix gouttes de lessive de soude. On soumet le liquide à l'ébullition et on centrifuge.

Pour les exsudats séro-fibrineux, le caillot ainsi traité par la lessive de soude se dissout très facilement, surtout si le liquide est mis au bain-marie à chaleur douce.

Procédé chorisimétrique. — Les caillots ainsi soumis à la digestion artificielle ou à l'homogénéisation sont susceptibles d'être agités avec l'éther et de former avec lui une émulsion qui entraînera les bacilles de Koch à la partie supérieure.

Dans le cas de ces liquides l'émulsion est plus stable

qu'avec les crachats et les matières fécales et l'éther offre un aspect opalescent.

On fait disparaître cette émulsion en chauffant très modérément à son niveau, en promenant sur toute sa hauteur et dans toute la circonférence la flamme très basse d'un brûleur Bunsen. On voit immédiatement les bulles d'air quitter le sein de l'émulsion, crever à la surface et la couche d'éther devenir parfaitement claire et limpide.

Dès lors, l'anneau constitué par les parties stables de l'émulsion se détache très nettement et peut être très facilement décanté. Mais il arrive parfois que certaines de ses parties adhèrent aux parois de l'appareil. Un simple rinçage à l'éther ramènera toutes les particules à leur véritable place.

Ainsi pratiqué, le procédé chorisimétrique donnera la totalité des bacilles du liquide à examiner.

La présence des bacilles de Koch dans le sang et dans les liquides spontanément coagulables a été étudiée en détail par Jousset et Bezançon (1903). Mais des critiques très vives ont été adressées à la méthode inoscopique et, par suite, aux résultats obtenus au moyen de cette méthode. Bezançon et Griffon par leur technique d'homogénéisation du caillot démontrent (1903) que les bacilles de Jousset ne résistent pas à une décoloration énergique par l'acide nitrique au tiers, cette résistance étant un des caractères essentiels de la réaction colorante du bacille de Koch. Ces auteurs se sont demandé si ces bacilles ne seraient pas des pseudo-tuberculeux, des bacilles qui subiraient pendant leur séjour dans un liquide séro-fibrineux une sorte de mordantage leur donnant la réaction de Ziehl, même passagèrement.

Par conséquent, pour l'examen de ces liquides, l'asepsie absolue est de règle et l'on doit employer pour la coloration du dépôt la méthode de Ziehl rigoureuse. En opérant dans ces conditions, Bezançon a constaté que les bacilles de Koch devenaient très rares et manquaient dans la plupart des cas.

CHAPITRE VI

Recherche du bacille de Koch dans les liquides non spontanément coagulables (urine, liquide céphalo-rachidien)

Très souvent, faute de symptômes qui appellent l'attention sur elle, la tuberculose rénale passe inaperçue. De même, le début de la tuberculose vésicale est toujours insidieux et, lorsque la cystite tuberculeuse est constituée, la différence est souvent difficile à établir entre celle-ci et la cystite blennorrhagique à forme douloureuse.

Aussi convient-il, pour éclairer le diagnostic ou dépister une tuberculose commençante, de pratiquer l'examen des urines.

L'urine destinée à cet examen doit être recueillie par cathétérisme, avec une sonde bien aseptisée et après avoir désinfecté l'entrée du méat.

Une autre méthode, celle de Duclaux et Enriquez, consiste à laisser uriner le malade et à ne recevoir dans un récipient stérile que la fin du jet, car les premières gouttes pourraient être contaminées par les microbes de l'urètre antérieur.

Les procédés qui ont pour but de détecter le bacille de Koch dans les urines peuvent se diviser en trois groupes :

1° *Procédés par décantation* et examen du culot après vingt-quatre heures.

2° *Procédés par coagulation* : On ajoute à l'albumine pure 4 volumes d'eau distillée : il agit longtemps et recueille le liquide opalescent qui surnage. Il ajoute 10 centimètres cubes

de ce liquide à l'urine et il chauffe au bain-marie. Il recherche les bacilles dans le précipité floconneux ainsi obtenu.

3° *Procédés par coagulation et centrifugation* : Le meilleur est celui de Jousset qui consiste à entraîner les bacilles dans le coagulum produit dans l'urine par l'addition de plasma salé. Celui-ci se prépare de la façon suivante :

Sang de cheval.....	} parties égales.
Eau salée à 40 p. 100.	

Centrifuger, décanter le plasma salé qui surnage et le placer dans une glacière en vase clos.

Pour coaguler l'urine, on fait le mélange suivant :

Urine	1 litre
Eau.....	1 à 3 litres
Plasma salé	30 à 40 grammes

Le coagulum obtenu est isolé par filtration. On lui ajoute 50 centimètres cubes de liquide fluoro-peptique, dont nous avons donné la formule à propos des liquides spontanément coagulables. On met le mélange à l'étuve à 38° et on agite toutes les demi-heures. On centrifuge ensuite et on recherche le bacille de Koch dans le culot. « C'est là un procédé sûr qu'on ne saurait trop recommander dans un laboratoire bien outillé » (Villaret, 1907).

Procédé chorisimétrique. — L'urine se prête fort bien à la recherche du bacille de Koch par ce procédé. Lorsqu'elle ne contient pas d'albumine, il est préférable d'opérer en milieu légèrement acide. La clarification est dans ce cas instantanée.

On pourra donc opérer sur de grandes quantités de liquide, car il suffira de décanter le liquide clair, de le remplacer par une nouvelle quantité d'urine, en ayant soin d'avoir toujours un excès d'éther. Quelquefois on observe, dans ces conditions, un coagulum éthéré presque solide, et l'on peut en certains cas renverser le tube sans que le coagulum laisse passer le liquide. Cette réaction, liée très

probablement à la présence de certaines albumines dans les urines, porte le nom de réaction de Jacquemet. Ce phénomène pourrait gêner l'observation des éléments bacillaires si l'on ne pouvait l'empêcher. Il suffit pour cela de pratiquer l'opération que nous avons préconisée pour les liquides spontanément coagulables, c'est-à-dire chauffer légèrement la partie du tube de verre qui se trouve au niveau de l'émulsion persistante.

La méthode chorisimétrique est applicable dans les mêmes conditions à l'analyse du liquide céphalo-rachidien.

Les procédés d'examen direct sans centrifugation donnent déjà de très bons résultats, Denigès et Sabrazès ont trouvé 5 fois sur 6 cas le bacille de Koch en grande quantité. Griffon dans presque tous les cas. Lutier dans plus de la moitié des cas. Quelquefois, alors qu'un premier examen est négatif, un second fait quelques jours après montre des bacilles (Bezançon).

L'agitation avec l'éther augmentera encore les chances de les retrouver.

CHAPITRE VII

Valeur de la recherche directe du bacille de Koch comparée avec les autres procédés de laboratoire utilisés pour le diagnostic de la tuberculose

On a imaginé, pour établir la nature tuberculeuse de certaines manifestations malades, une grande variété de méthodes basées sur l'étude des qualités physiques, chimiques, biologiques, histologiques des individus ou de leurs humeurs.

Nous allons signaler très rapidement les principales méthodes employées couramment.

La réaction à la tuberculine consiste à injecter à l'individu une dose faible de cette substance (de 1 à 5 milligrammes). La constatation d'une réaction thermique après cette injection pratiquée sur un sujet d'ordinaire apyrétique indiquerait une infection tuberculeuse. Des réactions comparables sont aussi obtenues avec d'autres substances : le sérum artificiel et l'iodure de potassium, par exemple. Enfin les statistiques fournies par les auteurs sont loin d'être concordantes dans leurs résultats. Un fait semble cependant ressortir de l'observation clinique des individus ainsi traités, c'est le danger de cette épreuve et l'extrême prudence qu'elle réclame.

Aussi, récemment, Calmette (1907) se basant sur les recherches de Wolff (de Berlin) chez les bovidés, instille dans un seul œil du sujet suspect une goutte de tuberculine sèche précipitée par l'alcool à 95° et en solution à 1 pour 100 dans l'eau distillée stérilisée. De trois à cinq heures après cette instillation

chez les tuberculeux, la conjonctive palpébrale s'injecte, devient rouge vif, s'œdématisé et il apparaît en même temps que du larmolement une sécrétion fibrineuse assez abondante; le sujet accuse un peu de gêne, une légère cuisson, mais pas de douleur. Ces signes de congestion atteignent leur maximum d'intensité entre six et dix heures après l'instillation, puis s'atténuent et disparaissent au bout de dix-huit heures chez l'enfant, au bout de vingt-quatre à trente-six heures chez l'adulte sans avoir été accompagnés de phénomènes généraux.

Cette méthode porte le nom d'ophtalmo-réaction et n'offre pas, semble-t-il, les dangers de l'injection de tuberculine.

Arloing et Courmont ont fait connaître le moyen d'obtenir des cultures de bacille de Koch homogène. Cette découverte permet l'emploi d'une méthode qui avait donné dans la fièvre typhoïde les meilleurs résultats : la séro-réaction. Le sérum d'un individu atteint d'une affection tuberculeuse possède la propriété d'agglutiner, de réunir en amas compacts les bacilles du liquide auquel on a ajouté ce sérum; cette agglutination s'observe soit à l'œil nu, soit au microscope.

Cette méthode ne présente pas les dangers de la tuberculine, mais ses résultats sont inconstants. La séro-réaction peut manquer chez des sujets manifestement tuberculeux ou exister dans d'autres maladies, la fièvre typhoïde, par exemple.

La radioscopie et la radiographie, d'après Bertherand, rendraient de grands services en révélant soit un foyer d'hépatisation, soit une adénopathie trachéo-bronchique, soit une collection purulente, dont la recherche est souvent si délicate chez les enfants. La technique de cet examen radioscopique est difficile, et difficile aussi l'interprétation des signes qu'il fournit.

On a utilisé dans le même but l'examen cytologique des humeurs de l'organisme et diversement interprété ses résultats.

La culture des produits tuberculeux par ensemencement sur divers milieux permet d'établir le diagnostic entre le bacille de Koch et les bacilles acido-résistants. En effet, ces der-

niers poussent très rapidement, parfois en quelques heures, même sur gélatine. Enfin ils forment dans leurs cultures des matières colorantes.

L'inoculation des produits suspects est faite à des animaux susceptibles de devenir facilement tuberculeux. Le cobaye est l'animal réactif par excellence. Le bacille de Koch détermine chez lui une maladie à extension progressive avec généralisation et réinoculable en série. Aucun bacille acido-résistant ne possède ces propriétés. Cette méthode, comme le fait remarquer Jousset, a plusieurs défauts : elle est infidèle dans les tuberculoses avirulentes à bacilles rare et disséminés ; elle est hasardée, car les animaux peuvent mourir accidentellement ; elle est trompeuse, les animaux ayant pu être antérieurement contaminés ; enfin, elle est lente.

Toutes ces méthodes sont basées sur une interprétation des résultats qu'elles fournissent. Aucune ne saurait équivaloir à la constatation directe des bacilles vivants ou morts dans les liquides à examiner.

De là la nécessité d'appliquer à la recherche des éléments microbiens en suspension dans ces liquides une méthode d'observation très précise, ne comportant pas de causes d'erreur.

Le procédé chorismétrique fait retrouver tous les bacilles qui sont dans les matériaux à examiner. Pour les crachats, la technique offre le maximum de simplicité, car leur homogénéisation est très facile et, d'autre part, leurs albumines ne réagissent pas au contact de l'éther. Dans les liquides séro-fibrineux, il permet d'examiner le caillot et le liquide. Le réseau de fibrine entraîne avec le caillot la plus grande partie des bacilles, mais il peut en laisser échapper quelques-uns à travers ses mailles, ainsi que le démontrent les expériences de Touchard (1902) consistant à provoquer de nouveaux caillots au moyen du plasma salé de Jousset : ceux-ci contiennent encore quelquefois des bacilles de Koch. Par conséquent, après avoir séparé le caillot du liquide, il suffit d'agiter ce dernier avec de l'éther pour provoquer l'ascension et la

découverte des quelques bacilles qui auraient pu rester en suspension. Dans les urines, les selles, le liquide céphalo-rachidien, il est applicable à la recherche de tous les microbes que contiennent ces diverses matières. De Nabias l'a montré très nettement pour les selles, dont la flore microbienne se retrouve avec toute sa variété dans le voile qui après leur agitation avec l'éther vient se former à la surface.

D'autre part, notre procédé chorisimétrique diminue les chances d'erreur, qui consistent à confondre les acido-résistants accidentels avec les bacilles acido-résistants vrais. L'action saponifiante de la soude enlève aux premiers la couche de graisse qu'ils ont prise aux milieux dans lesquels ils vivent et elle est sans action sur les seconds. De plus, la méthode de coloration rigoureuse que nous avons indiquée au Chapitre I contribuera encore à empêcher la confusion avec les deux espèces.

Par conséquent, le procédé chorisimétrique, par la sûreté et la rapidité des résultats, peut être comparé sans désavantage avec les procédés de diagnostic que nous avons signalés précédemment. Il pourra d'ailleurs être employé concurremment avec ceux-ci et leur prêter un sérieux appui.

CONCLUSIONS

I. — Le procédé chorisimétrique per ascensum est dû à un phénomène physico-chimique : l'entraînement des bacilles de Koch par émulsion.

II. — Ce procédé est applicable à l'étude du bacille de Koch dans toutes les humeurs de l'organisme.

III. — Il est essentiellement pratique, grâce à sa rapidité et à la simplicité de sa technique.

IV. — Il possède la valeur des autres procédés de laboratoire pour le diagnostic de la tuberculose.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse,
X. ARNOZAN.

Vu : *Le Doyen,*
A. PITRES.

Vu, et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 15 janvier 1908.
Le Recteur de l'Académie,
R. THAMIN.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ANGLADE. — Congrès de la tuberculose, 1903.
- ARLOING (S.). — Cultures et émulsions homogènes de bacilles de la tuberculose humaine en milieu liquide. C. R. Acad. Sciences. Paris, mai 1898.
- ARLOING (S.) et COURMONT (P.). — Cultures homogènes propres au séro-diagnostic.
- Séro-diagnostic de la tuberculose. *Gazette des Hôpitaux*, 1900.
- Congrès de la tuberculose, 1903.
- ARTHUS. — Chimie biologique.
- Coagulation des liquides de l'organisme.
- AUCLAIR (J.). — Les poisons du bacille tuberculeux humain. Thèse de Paris 1897.
- C. R. Acad. Sciences, 4 février 1907.
- BEZANÇON. — Soc. de Biologie, 10 janvier 1903 (Griffon et Philibert).
- Soc. de Biologie, 6 février 1903.
- Soc. médicale des Hôpitaux, 8 mai 1903 (Griffon et Philibert).
- Congrès de la tuberculose, 1903.
- Précis de microbiologie clinique, 1906.
- BIEDERT. — *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1886, n^{os} 42 et 43.
- *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1891, n^o 2, p. 32.
- BERNHEIM. — La tuberculose. Paris, 1904.
- CARRIÈRE. — Action du suc gastrique sur les bacilles tuberculeux. Soc. de Biol., 1901.
- COLLET. — Pathologie interne.
- COURATTE-ARNAUDE. — *Gazette hebdomadaire des Sciences médicales de Bordeaux*, 7 décembre 1902.
- COURMONT et POTET. — Bacilles acido-résistants de la nature. *Arch. de méd. exp.*, 1903.
- COURMONT et MANDOUL. — *Lyon médical*, 1906.
- CROUZON et VILLARET. — Bacilles pseudo-tuberculeux. *Rev. de la Tub.*, 1903.
- CRUCHET et LEPAGE. — Congrès de la tuberculose, 1903.
- DENIGÈS. — Chimie analytique.

- DUCLAUX. — Microbiologie.
— Le lait.
— Chimie biologique et microbiologique.
- FERRÉ. — Leçons sur la tuberculose. Bordeaux, 1904.
- FERRÉ et BUARD. — Congrès de la tuberculose, 1903.
- GAFKY. — In Traité Strauss : Tuberculose et son bacille.
- JACOBSON. — Société de Biologie, 1904.
- JOUSSET (A.). — Société médicale des Hôpitaux, 9 janvier 1903.
— *Semaine médicale*, 21 janvier 1903.
— L'inoscopie. *Archives de médecine expérimentale*, 1903.
— Les humeurs opalescentes de l'organisme. Thèse de Paris 1901.
- KÜHNE. — Die Untersuchung von Sputum auf Tuberkelbacillen. *Centralbl. für Bakt.*, VIII, 1890, p. 293.
- LEPAGE. — Thèse de Bordeaux 1907.
- MACÉ. — Traité de bactériologie.
- MANDOUL. — Bacille de Koch et séméiologie de la tuberculose pulmonaire. Thèse de Lyon 1905.
- MARTIN (Claude). — Pouvoir émulsif des urines. Thèse de Bordeaux 1901.
- MEUNIER. — Thèse de Paris 1898.
- MONGOUR et BUARD. — Rapport à la Réunion médico-chirurgicale des Hôpitaux de Bordeaux, 1899.
— Congrès international de la tuberculose, 1903.
— *Journal de médecine de Bordeaux*, octobre 1903.
— *Münchener medizinische Wochens.*, novembre 1903.
- NABIAS (DE). — Congrès de la tuberculose, 1903.
- NATTAN-LARRIER. — *Presse médicale*, 3 décembre 1903.
- PIÉRY. — *Lyon médical*, 1903.
- PIÉRY et MANDOUL. — *Arch. gén. de médecine*, mai 1905.
— Congrès de la tuberculose, 1903.
- POTET. — Bacilles acido-résistants. Thèse de Lyon 1902.
- SABRAZÈS. — Suc gastrique et bacilles tuberculeux. Soc. de Biol., 1898.
— Colorabilité des bacilles tuberculeux. *Ann. Inst. Pasteur*, 1903.
- SPENGLER. — *Deutsche medic. Woch.*, 1895, n° 15.
- STRASSBÜRGER. — *Munch. med. Woch.*, 1900, XLVII, s. 533.
- STRAUSS. — La tuberculose et son bacille.
- TOUCHARD. — Critique de la méthode inoscopique. *Rev. de la Tub.*, 1903.

